

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>5</sup> : C07K 7/00, 13/00, G01N 33/569 G01N 33/68, C07K 3/18, 3/22 C07K 3/20, C12N 15/10	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 91/12269 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. August 1991 (22.08.91)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE91/00106		(74) Anwalt: LEDERER, KELLER & RIEDERER; Lucile-Grahn-Straße 22, D-8000 München 80 (DE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 8. Februar 1991 (08.02.91)		
(30) Prioritätsdaten: P 40 03 826.2 8. Februar 1990 (08.02.90) DE		(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), AU, BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MIKROGEN MOLEKULARBIOLOGISCHE ENTWICKLUNGS-GMBH [DE/DE]; Westendstraße 125/G, D-8000 München 2 (DE).		
(72) Erfinder; und		Veröffentlicht
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : SOUTSCHEK, Erwin [DE/DE]; Schäftlarnstraße 126, D-8000 München 70 (DE). MOTZ, Manfred [DE/DE]; Schachnerstraße 7, D-8000 München 70 (DE).		<i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
<p><i>-M07K203:00 -M07K205:00 M07K207:00</i></p>		

(54) Title: IMMUNOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES OR POLYPEPTIDES FROM THE PARVOVIRUS B19

(54) Bezeichnung: IMMUNOLOGISCH AKTIVE PEPTIDE BZW. POLYPEPTIDE DES PARVOVIRUS B19

(57) Abstract

Immunologically active peptides or polypeptides with a partial amino acid sequence of the capsid protein VP1 and VP2 of parvovirus B19 are obtained which provide an economical, sensitive and specific test to detect antibodies against the human parvovirus B19. Short peptide sequences are identified which when used as an antigen serve to identify anti-B19 IgG-positive sera. The production of these peptides by gene-technological means is revealed. Other gene-technologically produced antigens which form stably in large quantities in E. Coli and can subsequently be separated from them act as additional antigens for IgG confirmation. Finally a set of antigens facilitates testing for the detection of IgM antibodies against the virus. In addition, the gene-technologically produced components of the surface proteins are substances which may be used for prophylactic immunisation.

(57) Zusammenfassung

Es werden immunologisch aktive Peptide oder Polypeptide mit einer Teilaminosäuresequenz der Kapsidproteine VP1 und VP2 des Parvovirus B19 zur Verfügung gestellt, die eine kostengünstige, sensible und spezifische Testdurchführung zur Bestimmung von Antikörpern gegen das humane Parvovirus B19 erlauben. Es werden kurze Peptidsequenzen identifiziert, die als Antigen eingesetzt zur Identifizierung von anti-B19-IgG-positiven Seren dienen. Weiterhin wird die Produktion dieser Peptide mit gentechnologischen Massnahmen offenbart. Andere gentechnologisch produzierte Antigene, die stabil in einer hohen Ausbeute in E. coli produziert und aus diesen anschliessend gereinigt werden können, dienen als zusätzliche Antigene für den IgG-Nachweis. Ein Set aus Antigenen schliesslich erlaubt Testdurchführungen zur Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen das Virus. Zusätzlich stellen die gentechnologisch erzeugten Bestandteile der Oberflächenproteine Substanzen dar, die für eine prophylaktische Immunisierung verwendet werden können.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MN	Mongolei
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	CB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BJ	Benin	GR	Griechenland	PL	Polen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

### Immunologisch aktive Peptide bzw. Polypeptide des Parvovirus B19

Das humane Parvovirus B19 (im folgenden kurz: B19) wurde 1975 zufällig in Plasmaproben von Blutspendern (Cossart, Y.E., Field, A.M., Cant, B., Widdows, D.: Parvovirus-like particles in human sera. Lancet I (1975) 72-73) mittels Gegenstromelektrophorese entdeckt. In den letzten Jahren wurde gezeigt, daß B19 bei Patienten mit chronisch-hämolytischer Krise eine aplastische Krise verursachen kann und das ätiologische Agens des Erythema infectiosum (EI) ist.

B19 weist elektronenmikroskopisch eine Größe von ca. 20nm auf. Die Partikel haben eine ikosaedrische Symmetrie. Neben den Viruspartikeln zeigen sich auch "leere" Kapside, die keine DNA enthalten. Die Dichte in  $\text{CsCl}_2$  beträgt 1,36 - 1,40g/ml. Das Virusgenom besteht aus einer einzelsträngigen DNA von 5,4kb. Die Nukleotidsequenz des Genoms eines Parvovirus B19 wurde von einem Klon abgeleitet, der beinahe das vollständige virale Genom enthielt (R.O. Shade et al. Journal of Virology (1986) S.921). In jedes Viruspartikel wird jeweils nur ein DNA-Strang von entweder Plus- oder Minusorientierung verpackt. B19 ist ein autonomes Parovirus, d.h. es benötigt zur Replikation kein Helfervirus.

Das Kapsid besteht aus zwei Polypeptiden mit Molekulargewichten von 83kDa (VP1) und 58kDa (VP2). Zusätzlich lassen sich drei Nicht-Strukturproteine von 52, 63 und 71kDa nachweisen.

Die DNA kodiert im 5'-Bereich für die Strukturproteine des Kapsids. Die kodierenden Bereiche dieser Strukturproteine sind bis auf einen zusätzlichen N-Terminus des VP1 identisch. Verursacht wird dieser Unterschied durch "splicing"-Vorgänge auf der mRNA-Ebene, bei denen im Fall von VP2 der translationelle Start für VP1 herausgenommen wird und somit die Translation erst mit dem kürzeren VP2 starten kann.

Untersuchungen an verschiedenen, weltweit gefundenen B19-Isolaten zeigten, daß sich diese zum Teil durch Restriktionsenzym-Muster auf DNA-Ebene unterscheiden. Diese Unterschiede korrelieren allerdings nicht mit dem klinischen Spektrum der B19-Infektion.

Bisher konnte keine permanente Zelllinie gefunden werden, in der sich B19 vermehren lässt. Ebensowenig gelang es bisher, für B19 ein Versuchs-Tiermodell zu etablieren. Allerdings lässt sich B19 in primären Knochenmarks-Zellen unter Anwesenheit von Erythropoetin vermehren. So konnte der Replikations-Mechanismus des Virus geklärt und gezeigt werden, daß Zellen der Erythropoese Zielzellen dieser Infektion sind. Inzwischen gelang die Inokulation von B19 in fetalen erythropoetischen Zellen und Erythroblasten eines Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie.

B19 verursacht das Erythema infektiosum (Ringelröteln), eine in der Regel benigne verlaufende Infektionserkrankung, die meist zwischen dem Kindes- und frühem Erwachsenenalter auftritt. Außerdem kann die B19-Infektion bei Patienten mit chronisch-hämolytischer Anämie (Sichelzellenanämie usw.) aplastische Krisen und bei Patienten mit angeborenen oder erworbenen Immunmangelzuständen chronische Knochenmarks-Aplasien verursachen.

In der Schwangerschaft kann die B19-Infektion in etwa 10 - 15% zu Hydrops fetalis mit resultierendem interuterinalem Fruchttod

führen. Ferner ist B19 mit dem Auftreten der Purpura Schönlein-Henoch assoziiert.

B19 wird in der Regel durch Tröpfcheninfektion, aber auch durch antigen-positive Blutkonserven und Gerinnungspräparate übertragen.

Da bisher keine permanente Zelllinie bekannt ist, in der sich B19 in großen Mengen gewinnen lässt, fehlt so eine Quelle zur Gewinnung von Antigenen für diagnostische Tests. Bisher behilft man sich mit B19-Virus, das in Blutkonserven von Spendern, die sich gerade in virämischen Stadium der Infektion befinden, zufällig entdeckt wird.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, immunologisch aktive Polypeptide zur Verfügung zu stellen, die mit den hier vorgestellten Testsystemen den Nachweis von B19-spezifischen Antikörpern der IgG und IgM-Klasse ermöglichen. Damit ergeben sich folgende Anwendungsmöglichkeiten:

- Serumdiagnose akuter bzw. abgelaufener B19-Infektionen in der Dermatologie, Hämatologie, Gynäkologie, Rheumatologie und Pädiatrie.
- Bestimmung des B19-Immunstatus bei Schwangeren
- Untersuchung von Blutkonserven oder Plasmaspenden zum Ausschluß der Übertragung von B19-Antigen, da durch anti-B19-IgG positives Blut oder Plasma höchstwahrscheinlich kein B19-Virus mehr übertragen werden kann.
- Selektion von anti-B19 positiven Plasmaspendern für die Produktion von B19-Hyperimmunglobulin-Präparaten.

Aufgrund des breiten klinischen Spektrums der durch B19 verursachten Erkrankungen sowie der Gefährdung für B19-seronegative Schwangere ist die Einführung von Testreagenzien dringend von Nöten.

Es hat sich herausgestellt, daß brauchbare immunologisch aktive Polypeptide nicht ohne weiteres hergestellt werden können. Die gentechnologische Darstellung von kurzen Peptiden ist ebenso wie

die von großen Polypeptiden nur dann in einer zufriedenstellenden Ausbeute möglich, wenn geeignete Expressionsvektoren verwendet werden. Verhältnismäßig kurze Peptide können zwar leicht synthetisch hergestellt werden, erforderlich ist jedoch eine genauere Kenntnis der immunologischen Wirksamkeit.

Gegenstand der Erfindung sind immunologisch aktive Peptide, die einen Teil der Aminosäuresequenz der Kapsidproteine VP 1 oder VP 2 des Parvovirus B19 aufweisen. Diese Peptide sind dadurch gekennzeichnet, daß sie frei sind von Verunreinigungen, die den Nachweis von gegen Parvovirus B19 gerichteten Antikörpern stören. Diese Eigenschaft ist von großer Bedeutung, da solche Präparationen von Peptiden nicht brauchbar sind, die aufgrund der Herstellung Bestandteile enthalten, die mit den nachzuweisenden Antikörpern reagieren. Ein Beispiel für eine derart unerwünschte Verunreinigung ist Protein A, das spezifisch mit dem Fc-Anteil von IgG-Antikörpern reagieren kann. Ein besonderer Vorteil der erfindungsgemäßen immunologisch aktiven Peptide ist, daß sie durch die erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren in guter Ausbeute hergestellt werden können. Werden nämlich die für einen diagnostischen Test benötigten Antigene nicht in einer ausreichenden Menge bei den Herstellungsverfahren synthetisiert, kann nicht die erforderliche Ausbeute nach den anschließenden Reinigungsverfahren erhalten werden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung konnten weiterhin kurze Peptidsegmente aus dem VP 1, genauer aus dem Bereich von VP 1, der nicht mit VP 2 übereinstimmt, bestimmt werden, deren Epitope zum zuverlässigen Nachweis von Antikörpern gegen Parvovirus B19 in den Untersuchungsflüssigkeiten, insbesondere Seren geeignet sind. Dieser Bereich wird im folgenden als VP 1-VP 2 bezeichnet. Abb. 3 zeigt beispielhaft die Anordnung von einigen Peptiden (PAPEP 1-PAPEP 8) in dem Bereich (VP 1-VP 2). Auch wenn diese Peptide bevorzugt sind, können ebenso andere Peptide mit 8-50 Aminosäuren, bevorzugt 10 bis 32 Aminosäuren, aus dem Bereich VP 1-VP 2 eingesetzt werden. Dieser Bereich entspricht etwa dem Polypeptid PAN1, das in Abb. 2-1 dargestellt ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird dieser kleine, immundominante und B19-spezifische Bereich im serologischen Test eingesetzt. Besonders bevorzugt wird dabei ein Gemisch synthetischer Peptide eingesetzt, wobei diese Peptide die in Beispiel 3 gezeigten Aminosäuresequenzen PAPEP 1 - PAPEP 8 aufweisen.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die in Abbildung 2 dargestellten Aminosäuresequenzen der gentechnologisch dargestellten immunologisch aktiven Peptide PAN-1, PAN-2, PAN-3, PAN-4, PCE, PANSE UND PAPST eingesetzt. Hierbei ist es in der Regel ausreichend, wenn ein Peptid in dem Test verwendet wird. In besonderen Fällen können aber auch zwei oder mehr dieser Peptide eingesetzt werden.

Hergestellt werden können die erfindungsgemäßen Peptide entweder synthetisch oder gentechnologisch. Bevorzugt werden die kurzen Peptide, die in Beispiel 3 näher erläutert sind, synthetisch hergestellt. Die längeren Peptide jedoch werden bevorzugt gentechnologisch hergestellt.

Zunächst wurden die kodierenden Bereiche der viralen DNA mittels zweier Polymerase-Ketten-Reaktionen (polymerase chain reaction, PCR) aus dem Serum eines infizierten Patienten amplifiziert und in Plasmiden für die weitere Vermehrung in *Escherichia (E.) coli* kloniert. Nach weiteren Subklonierungsschritten wurden dann verschiedene Bereiche daraus in *E. coli* gentechnologisch exprimiert und die dabei entstehenden Antigene auf ihre Verwendung für den Nachweis von Antikörpern gegen das Virus untersucht. Eine direkte Herstellung der erfindungsgemäßen Peptide in Expressionsvektoren ist aufgrund verschiedener Schwierigkeiten nicht möglich. Erfindungsgemäß wird daher das virale Proteinsegment an ein stabil exprimierbares Protein anfusioniert. Dieses Fusionsprotein kann nach der Aufreinigung direkt als Antigen für den IgG-Nachweis eingesetzt werden. Bevorzugt wird jedoch der Parvovirus spezifische Anteil durch geeignete Methoden abgespalten, weiter aufgereinigt und dann für serologische Tests eingesetzt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin Testkits für die Bestimmung von Antikörpern, die gegen Parvovirus B19 gerichtet sind. Die erfindungsgemäßen immunologisch aktiven Peptide können grundsätzlich in allen diagnostischen Testkits zum Nachweis von

Antikörpern gegen Parvovirus B19 verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Testkits wird die Festphase geeigneter Mikrotiterplatten oder Polystyrol-Kugeln mit den erfindungsgemäßen immunologisch aktiven Peptiden beschichtet. Nach Inkubation mit der Untersuchungsflüssigkeit (Serum-Probe) in einer geeigneten Verdünnung wird nach üblichen Waschschritten Enzym- oder radioaktiv-markiertes anti-human-IgG zugegeben. Das Ausmaß der Substratumsetzung bzw. der gebundenen Radioaktivität zeigt dann an, ob in der Serum-Probe gegen Parvovirus B19 gerichtete Antikörper vorhanden sind.

Die erfindungsgemäßen Testkits werden üblicherweise an Laboratorien von Ärzten, Krankenhäusern, Untersuchungsanstalten etc. geliefert. Sie enthalten regelmäßig alle zur Testdurchführung benötigten Reagenzien. Übliche Testreagenzien wie Pufferlösungen etc. werden jedoch manchmal nicht mitgeliefert. In der Regel enthalten die Testkits Mikrotiterplatten oder Polystyrolkugeln, die entweder mit einem oder mehreren erfindungsgemäßen Peptiden, oder mit anti-Antikörpern beschichtet sind. Weiterhin können die Testkits, je nach Testprinzip, ein oder mehrere erfindungsgemäße Peptide enthalten. Schließlich umfassen die Testkits noch eine Anzeigekomponente, die eine Auswertung des Testergebnisses ermöglicht.

Bei anderen bevorzugten Testkits werden die Antigene an die Festphase von Mikrotiterplatten oder Polystyrol-Kugeln gebunden. Nach Inkubation des Testserums, geeigneten Wasch- und Absättigungsschritten wird ein spezifischer, enzymatisch oder radioaktiv markierter Antikörper gegen die B19-Antigene zugegeben und dessen Substratumsetzung bzw. die gebundene Radioaktivität gemessen. Da es sich hierbei um einen Inhibitionstest handelt, zeigt eine geringe Substratumsetzung bzw. geringe Radioaktivität das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern an.

Für den Nachweis von IgM-Antikörpern gegen B19 können die an Festphasen gekoppelten erfindungsgemäßen Peptide ebenfalls eingesetzt werden. Bei diesem Nachweisverfahren werden zunächst die IgG-Antikörper durch Zugabe von mit Protein A beschichteten

Kugeln zu den Untersuchungsflüssigkeiten eliminiert. Der Nachweis von gebundenen Antikörpern erfolgt dann mit einem anti-human IgM-Antikörper, der enzymatisch oder radioaktiv markiert ist.

Bei einem weiteren bevorzugten Testkit wird das Prinzip des sog. "μ-capture assays" verwendet. Mittels an die feste Phase gebundenen anti-human IgM-Antikörpern wird zuerst das IgM aus der Untersuchungsflüssigkeit (Serum) gebunden. Dann werden die erfindungsgemäßen immunologisch aktiven Peptide zugegeben. Das Ausmaß der Bindung der Antigene und somit die Menge an vorhandenem Anti-B19-IgM kann dadurch erfolgen, daß entweder die Antigene radioaktiv oder mit anderen Substanzen (Digoxigenin, Avidin) markiert sind und somit nachweisbar sind, oder daß ein zweiter markierter Antikörper gegen die B19-Antigene eingesetzt und dessen Bindung gemessen wird.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ganz besonders bevorzugt sind die ELISA-(enzyme linked immunosorbent assay)-Testkits.

Erfindungsgemäß werden auch DNA-Sequenzen zur Verfügung gestellt, die für den direkten Nachweis des Virus in Untersuchungsproben (Seren, Biopsien etc) verwendet werden können. Bevorzugt werden zwei DNA-Primer verwendet, die sich spezifisch an DNA-Bereiche im VP 1 anlagern. Mittels eines käuflich erhältlichen Polymerase-chain-reaction-Kits kann dann eine Amplifizierung des dazwischen liegenden Bereiches erreicht werden. Nachgewiesen wird die dann in geeigneter Weise fixierte amplifizierte DNA durch eine geeignete DNA-Sequenz. Hergestellt wird diese für die Hybridisierung eingesetzte DNA mit Hilfe eines Plasmides, das den zwischen den beiden Primern liegenden DNA-Bereich enthält.

Selbstverständlich dürfen die Primer Sequenzen nicht in der zur Hybridisierung eingesetzten DNA vorhanden sein. Die Sequenz der verwendeten Primer und deren Anordnung zueinander ist in Abb. 1 dargestellt.

Schließlich werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Impfstoffe gegen Parvovirus B19 zur Verfügung gestellt. Hierbei

werden die erfindungsgemäßen immunologisch aktiven Peptide zusammen mit geeigneten Adjuvantien den zu schützenden Personen gegebenenfalls mehrmals appliziert. Die dadurch hervorgerufene Produktion von Antikörpern kann einen Schutz vor Infektion mit Parvovirus B19 bewirken.

## BEISPIEL 1:

Gewinnung von Parvovirus B19 VP 1- und VP 2-kodierenden Sequenzen aus Patientenserum

Von einem Patienten mit akuter Infektion (Erythema infectiosum) wurde aus 1ml Serum virale DNA durch Proteinase K-Verdau in 1% SDS, Phenolextraktion und anschließender Alkohol-Fällung isoliert (Diese und auch alle folgenden Schritte zur Gewinnung, Verarbeitung und Expression von DNA, sowie auch die Darstellung von rekombinanten Proteinen und grundlegende Schritte zu deren Reinigung sind in: Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982) Molecular cloning. Cold Spring Harbor, N.Y. ausführlich dargestellt). Diese DNA wurde in 50 $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen und jeweils dann 1 $\mu$ l für die Amplifizierung mittels der "polymerase chain reaction" und synthetischen Oligodesoxynukleotiden eingesetzt. Für die Amplifizierung der kodierenden Bereiche der Oberflächenproteine wurden zwei Primer-Paare verwendet; eines davon für die Gewinnung des VP 1-Anteils, das zweite Paar für das gesamte VP 2. Die als Primer verwendeten Oligodesoxynukleotide besitzen an ihren jeweiligen 5'-Enden Sequenzen, die nicht mit der Parvovirus-Sequenz homolog sind, für Restriktionsenzym-Schnittstellen kodieren und deswegen geeignet sind, die aus der PCR entstandenen DNA-Fragmente in geeignete Vektoren zu klonieren. Es wurden die in Abb. 1 mit 0-1 bis 0-5 bezeichneten Primer verwendet.

Jeweils fünf Ansätze mit je 1 $\mu$ l isolierter Parvovirus DNA wurden mit den beiden Primer-Paaren in einem Volumen von 100 $\mu$ l amplifiziert. Die Bedingungen dabei waren: 1,5min Denaturierung bei 94°C, 2min Anlagerung der Primer bei 45°C, 4min Synthese bei 72°C; insgesamt 50 Zyklen; Puffer, Substrate und Taq-Polymerase wurden dabei nach Angaben des Herstellers (Cetus/Perkin-Elmer, Überlingen, BRD) eingesetzt.

Die amplifizierten DNA-Fragmente aus den beiden unterschiedlichen Ansätzen (für VP 1 und VP 2) wurden jeweils vereinigt, mittels Alkohol-Fällung präzipitiert, mit 70% Alkohol gewaschen,

getrocknet, in einem Volumen von 200 $\mu$ l TE-Puffer gelöst und mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII verdaut. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente in einem 1,2%igen Agarose-Gel erfolgte dann die Isolierung der entsprechenden DNA-Banden (709bp für VP 1, 1704bp für VP 2) und Insertion in die EcoRI und HindIII Stellen des Vektors PUC12 (Pharmacia, Schweden). Nach Transformation der Plasmide in E.coli JM109 (Pharmacia, Schweden) wurden Bakterienklone mit Parvovirus-DNA-Inserts durch Restriktionsverdau charakterisiert. Die entsprechenden Klone erhielten die Namen pUC12PAN für den VP 1-Anteil-kodierenden Bereich und pUC12VP2 für den VP 2-kodierenden Bereich.

## BEISPIEL 2

Gentechnologische Darstellung von VP 1-Anteil und VP 2 aus E.coli-Zellen

### a) VP1-Anteil:

#### 1) PAN-1

Aus dem Plasmid pUC12PAN wurde der VP1-kodierende Bereich mit BclI und HindIII (siehe Abb.1, die HindIII-Stelle stammt aus dem pUC-Vektor) isoliert und hinter das 3'-Ende eines verkürzten  $\beta$ -Galactosidase-Gens des Vektors (z.B. pBD2) in die Restriktionsschnitt-Stellen BamHI und HindIII inseriert. E.coli-Zellen mit daraus resultierenden Plasmiden exprimieren nach Induktion mit IPTG in großer Menge ein  $\beta$ -Gal:::VP1-Fusionsprotein (ca. 67kDA), welches im Immunoblot (Western Blot) sehr stark mit anti-Parvovirus B19-positiven Seren reagiert. Eine Reinigung dieses Proteins kann sehr leicht mit konventionellen Methoden erreicht werden, indem die Unlöslichkeit des Proteins ausgenutzt wird. Nach Lyse der Zellen wird die Pelletfraktion mit Detergentien wie Triton-X100 und Octyl-gluco-pyranosid gewaschen, das Fusionsprotein anschließend mit 8M Harnstoff/1% Mercaptoethanol in Lösung gebracht und durch DEAE-Chromatographie mit einem NaCl-Gradienten von zellulären Verunreinigungen abgetrennt.

Eine Abspaltung des VP1-Anteils aus dem Fusionsprotein kann durch BrCN-Spaltung erreicht werden, da die VP1-Proteinsequenz mit einem Methionin beginnt und im Fragment selbst diese Aminosäure nicht mehr auftaucht; im bakteriellen Fusionsanteil dagegen tritt Methionin relativ oft auf, so daß dieser Anteil in sehr kleine Bruchstücke zerlegt wird. Nach der Spaltung in 35% Ameisensäure und 0,1mg/ml BrCN für 4h bei Raumtemperatur wurde die Probe lyophilisiert, in 8M Harnstoff, 2mM DTE (Dithiothreitol) gelöst und mittels DEAE-Chromatographie in einem NaCl-Gradienten aufgereinigt. Das hieraus resultierende VP1-Fragment wurde PAN-1 benannt und kann direkt für serologische Bestimmungen verwendet werden. Die Aminosäure-Sequenz ist in Abb. 2-1 angegeben.

Als weitere Konstrukte wurden Plasmide generiert, die für Fusionsproteine bestehend aus der Glutathion-S-Transferase aus *Schistosoma japonicum* (Smith, D.B. and Johnson, K.S.: Single step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 67 (1988) 31-40) und dem VP1-Anteil kodieren. Es kann aber auch ein anderer Fusionspartner verwendet werden, solange dieser nicht den diagnostischen Test stört.

### 2) PCE:

Aus pUC12PAN wurde das B19-DNA-Fragment nach BclI/PvuII Verdau (618bp) isoliert und in pGEX1 in die BamHI und SmaI Stellen integriert (pGEX1PAN). Das entstehende 52kDa-Fusionsprotein wurde mittels Glutathion-gekoppelter Agarose aus dem Überstand gereinigt und als Antigen für die serologischen Teste in Beispiel 4 eingesetzt (Name: PCE). Die Aminosäure-Abfolge dieses Antigens ist in Abb. 2-2 aufgeführt.

### 3) PAN-2:

Aus pUC12PAN wurde ein 458bp Fragment mit BclI/HincII isoliert und nach Zwischenklonierungen in anderen Vektoren in pGEX2 (pGEX2PAN) inseriert. Die Insertion des Fragments im selben Leserahmen kann

auch durch die Verwendung von synthetischen Oligodesoxynukleotiden erreicht werden. An der Fusions-Stelle von Glutathion-S-Transferase und dem VP1-Segment ist die Aminosäure-Sequenz, die von Thrombin erkannt wird, so daß der B19-Anteil durch dieses Enzym vom Fusionspartner abgespalten werden kann. Es kann auch jeder andere Fusionspartner verwendet werden, wenn er diese Protease-Erkennungssequenz besitzt. Die Aminosäure-Sequenz des Antigens, sowie anfusionierte Fremdaminosäuren (in Fettdruck) ist in Abb. 2-3 angegeben.

4) PAN-3:

Aus pUC12PAN wurde ein 458bp Fragment mit BclI/HincII isoliert und nach Zwischenklonierungen in anderen Vektoren in pGEX3 (pGEX3PAN) inseriert. Die Insertion des Fragments im selben Leserahmen kann auch durch die Verwendung von synthetischen Oligodesoxynukleotiden erreicht werden. An der Fusions-Stelle von Glutathion-S-Transferase und dem VP1-Segment ist die Aminosäure-Sequenz, die vom Protease Faktor Xa erkannt wird, so daß der B19-Anteil durch dieses Enzym vom Fusionspartner abgespalten werden kann. Es kann auch jeder andere Fusionspartner verwendet werden, wenn er diese Protease-Erkennungssequenz besitzt. Die Aminosäure-Sequenz des Antigens, sowie anfusionierte Fremdaminosäuren (in Fettdruck) ist in Abb. 2-4 angegeben.

5) PAN-4:

Aus pUC12PAN wurde das gesamte B19-DNA-Insert durch BclI und PstI Verdau gewonnen und nach verschiedenen Zwischenklonierungs-Schritten in den Vektor pGEX2 inseriert. Erhalten wurde dabei das Plasmid pGEX2PAN. Die Insertion des Fragments im selben Leserahmen kann auch durch die Verwendung von synthetischen Oligodesoxynukleotiden erreicht werden. An der Fusions-Stelle von Glutathion-S-Transferase und dem VP1-Segment ist die Aminosäure-Sequenz für die Protease Thrombin, so daß der B19-Anteil durch dieses Enzym vom Fusionspartner abgespalten werden kann. Es kann auch ein geeigneter anderer Fusionspartner verwendet werden, wenn er diese Protease-Erkennungssequenz besitzt. Die Aminosäure-

Sequenz des Antigens, sowie anfusionierte Fremdaminosäuren (in Fettdruck) ist in Abb. 2-5 angegeben.

Eine Reinigung der Antigene kann durch einfache Affinitäts-Chromatographie mit einer Glutathion-gekoppelten Gelmatrix erreicht werden.

Zur weiteren Aufreinigung der auf pGEX 2 und 3 beruhenden Fusionsproteine wurde eine Abspaltung des B19-Anteils durch Verdau mit Trombin bzw Faktor X nach Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim) durchgeführt. Die Bruchstücke wurden dann nochmals Affinitäts-chromatographisch aufgereinigt. Die S-Glutathion-Transferase kann dabei selektiv herausgefischt werden, der Parvovirus Proteinanteil ist in Durchlauf zu finden und kann nach einer abschließenden DEAE-chromatographischen Auftrennung in serologischen Tests eingesetzt werden.

Alternativ hierzu kann aber auch die Protease direkt zu der Glutathion-gekoppelten Gelsuspension mit dem angebundenen Fusionsprotein gegeben werden. Nach einer Inkubationszeit von ca. 1h lässt sich das abgespaltene VPI-Fragment aus dem Gel waschen, während der S-Glutathion-S-Transferase-Anteil an die Gelmatrix gebunden bleibt.

#### b) VP-2-Anteil:

##### 1) VP-2

Bedingt durch die Auswahl der PCR-Primer sowie des Vektors ist der kodierende Bereich für VP2 im Plasmid pUC12VP2 bereits im richtigen Leserahmen und kann nach Induktion mit IPTG aus der unlöslichen Fraktion des Bakterienlysats, ähnlich wie für pBD2PAN beschrieben, aufgereinigt werden. Die Aminosäure-Sequenz des rekombinanten Antigens ist in Abb.2-6 gezeigt.

##### 2) PANSE:

Überraschenderweise zeigte sich, daß eine Verkürzung der VP2-kodierenden Sequenz eine erhebliche Steigerung der Proteinausbeute

mit sich bringt, daß dieses verkürzte Antigen stabil exprimierbar ist, auch während der Reinigung nicht degradiert wird sowie auch noch dieselbe Reaktivität mit anti-B19 positiven Seren aufweist. Dieses Expressionsplasmid (pUC19PANSE) wurde erhalten, indem der 5'-Bereich von VP2 um 355bp bis zu einer NsiI-Stelle verkürzt wurde. Dieses Fragment wurde in pUC19 (Pharmacia, Schweden) inseriert, das denselben Leserahmen im lacZ-Peptid aufweist wie die B19 Sequenz. Da aufgrund der PCR Primer am 3'-Ende eine HindIII-Stelle sitzt, mußte durch Zwischenklonierung noch eine EcoRI-Stelle geschaffen werden, um das gewünschte Fragment in die PstI und EcoRI Stellen von pUC19 inserieren zu können.

Das Antigen mit einer Größe von ca. 38kDa (PANSE) kann sehr einfach aus der Pellet-Fraktion des Bakterien-Lysats nach Lösen in 4M Harnstoff durch DEAE-Chromatographie von Verunreinigungen getrennt werden. Die Aminosäure-Sequenz des Antigens ist in Abb. 2-7 angegeben.

### 3) PAPST:

Von dem Plasmid pUC12VP2 wurde durch PstI Verdau ein 716bp großes Fragment isoliert, das den N-terminalen Bereich von VP-2 kodiert. Nach Insertion des Fragments in den Vektor pUC9 (Pharmacia, Schweden) in die selbe Orientierung der Leserahmen wie dem lacZ des Vektors (charakterisiert durch Restriktionsenzym-Verdau), wird das B19-Antigen mit einer Größe von ca 33kDa in sehr großer Menge (ca. 10% des Gesamt-E.coli-Proteins) produziert. Eine Aufreinigung kann ähnlich wie bei pBDAN aus den unlöslichen Bestandteilen durch Lösen in 8M Harnstoff und anschließende DEAE-Chromatographie erfolgen. Die Aminosäure-Sequenz ist in Abb.2-8 aufgezeigt.

### c) gesamtes VP1/VP2:

Das Plasmid pUC12PAN wurde mit PstI und HindIII geöffnet und der VP2 kodierende Bereich aus pUC12VP2 nach HindIII und partiellem PstI-Verdau als 1,7kb Fragment inseriert (pUC12VP1/2).

## Expression VP1/2-enthaltender Antigene in E. coli:

## 1) PAV-1-B:

pUC12VP1/2 wurde mit EcoRI und BamHI geschnitten, eine 1466 bp große DNA-Bande isoliert und dieses anschließend in die EcoRI/BamHI Stellen des Vektors pUC18stop eingesetzt. pUC18 stop gleicht den oben erwähnten pUC-Vektoren; im Unterschied zu diesen enthält er jedoch zwischen der PstI und HindIII Stelle ein synthetisches Oligodesoxynukleotid, das für Translations-Stop-Signale sowie für den Stop der Transkription kodiert. Somit hat die Polylinker-Region des Vektor folgende Sequenz:

ATG ACC ATG ATT ACG **AAT** TCG AGC TCG GTA CCC GGG **GAT** CCT CTA GAG  
TCG ACC TGC AGT **AAT** TAA TTA **GAT** CTC GAG CCC GCC TAA TGA GCG GGC  
TTT TTT **AAG** CTT

(Die Restriktionsschnittstellen EcoRI - GAATTC, BamHI - GGATCC, PstI - CTGCAG, BgIII - AGATCT und HindIII - AACGTT sind durch Fettdruck markiert)

Der so erhaltene Vektor (pUC-V1-B) kodiert das VP-1-Strukturprotein vom Start bis zur Aminosäure 486 gefolgt von einigen Aminosäuren des pUC-Polylinkers und wird terminiert durch die Stop-Codons des inserierten Oligodesoxynukleotids. Das exprimierte Antigen (PAV-1-B) wird in sehr guter Ausbeute nach IPTG-Induktion in den E.coli-Zellen produziert und besitzt eine Größe von 60 kDa. Seine Aminosäuren-Abfolge ist in Abb. 2-9 dargestellt, durch Fettdruck hervorgehobene Aminosäuren sind nicht B19-spezifisch und werden durch pUC-Sequenzen kodiert. Die Reaktivität mit anit-B19-positiven Seren ist sehr gut und eine effiziente Aufreinigung lässt sich durch Entfernen löslicher E.coli-Proteine, Lösen in 8M Harnstoff und konventioneller Ionen-Austauscher-Chromatographie (wie beschrieben) erreichen.

## 2) PAV-1-N:

Der oben beschriebene Vektor pUCVP-1-B wurde mit EcoRI und NsiI verdaut. Die so entstehende 1137bp große Bande wurde in den Vektor

pUC18stop in die EcoRI und PstI Stellen inseriert (siehe oben). Der entstehende Vektor pUCVP-1-N kodiert das Strukturprotein vom Start bis zur Aminosäure 377; das Antigen (PAV-1-N) wird nach IPTG-Induktion in den E.coli-Zellen etwas schlechter produziert als das oben beschriebene Antigen PAV-1-B. Seine Größe ist 45 kDa, die Reaktivität mit anti-B19 Seren gut. Die Aminosäurenabfolge ist in Abb. 2-10 angegeben, Aminosäuren mit Fettdruck werden vom pUC-Vektor kodiert und sind nicht B19 spezifisch.

Die Aufreinigung des Antigens kann wie bei PAV-1-B erreicht werden.

3) Expression der unter c)1) und c)2) beschriebenen Antigene als GST-Fusionsproteine

Die beiden Vektoren pUCVP-1-B und pUCVP-1-N wurden mit EcoRI/BglII verdaut und die entstehenden ca. 1480bp bzw. 1150bp großen Banden isoliert, wobei die vom pUC18stop mit eingeführten Translations-Stop-Signale mit übernommen werden. (Die BglII-Stelle ist in der oben angeführten pUC18stop-Polylinker-Sequenz angegeben, die BclI-Stelle (TGATCA) unmittelbar vor dem Start der Translation wurde mit den für die DNA-Amplifikation verwendeten Primern eingeführt - siehe Abb. 1, 0-1). Die beiden Fragmente, die dieselben 5'-Sequenzen, jedoch unterschiedlich lange Bereiche von VP-1 kodieren, wurden nun in den oben beschriebenen Vektor pGEX-1 eingesetzt. Da pGEX-1 für die Insertion des 3'-Endes eines Fragments nur die Restriktions-Schnitt-Stellen SmaI und EcoRI zur Verfügung hat, mußte zuerst noch eine für SmaI (blunt end) kompatible Stelle geschaffen werden. Dies erfolgte durch Insertion der beiden DNA-Fragmente in die Restriktions-Stellen EcoRI und BamHI (kompatibel mit BglII) des Vektors pIC20H (The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation, J.L. Marsh, M. Erfle and E.J. Wykes, Gene, 32 (1984) 481-485). Von den beiden entstandenen Vektoren wurden nun die beiden Fragmente mit BclI und HincII (blunt end - Schnitt) wiederum isoliert und in pGEX-1 in BamHI und SmaI inseriert. Da HincII auch in der B19-Sequenz schneidet,

wurden die beiden Fragmente durch einen partiellen HincII-Verdau isoliert.

Die beiden pGEX-Vektoren exprimieren nun Fusionsproteine bestehend aus der Glutathion-S-Transferase gefolgt von den beiden unterschiedlich langen VP-1 Segmenten. Das aus pUCVP-1-B stammende und nun in pGEXVP-1-B sitzende Fragment ergibt ein Fusionsprotein mit ca. 87kDa; das kleinere, nur bis Aminosäure 377 kodierende Fragment ein Fusionsprotein in der Größe von 72kDa. Die Aminosäureabfolgen sind in Abb. 2-9 und 2-10 angegeben. Der einzige Unterschied ist, daß die fünf N-terminalen Aminosäuren wegfallen und statt dessen durch die Glutathion-S-Transferase ersetzt sind.

#### 4) Weitere Expression von VP1/VP2:

Aus dem Plasmid "pUC12VP1/2" mit der gesamten VP1 und VP2 kodierenden Region wurde nach EcoRI- und HindIII-Verdau ein 2,4kb-Fragment isoliert und in den eukaryotischen Expressionsvektor pMDIII (Motz, M., Deby, G., Jilg, W., Wolf, H.: Expression of the Epstein-barr virus major membrane proteins in Chinese hamster ovary cells. Gene, 44 (1986) 353-359. (Erhältlich bei ATCC)) nach EcoRI und HindIII Verdau inseriert. Dieses Plasmid wurde anschließend wieder mit SalI linearisiert und noch ein 2,4kb-SalI-Fragment mit einem Dihydrofolat-Reduktase-Gen (DHFR) sowie Regulationssequenzen eingesetzt. Das so erhaltene Plasmid pMDIIIVP1/2 wurde in DHFR-negative CHO-Zellen transfiziert. Nach Selektion auf  $\alpha$ -minus Medium (gibco) wurden entstehende Kolonien isoliert und nach dem Auswachsen mit steigenden Konzentrationen an Methotrexat (MTX) amplifiziert. Von diesen Zellkulturen können Partikel mit VP1/VP2 aus dem Kulturüberstand gereinigt werden.

Weiterhin wurde das 2,4kb-Fragment aus pUC12VP1/2 nach EcoRI/HindIII-Verdau in einen Vektor inseriert, der neben der HindIII-Stelle noch eine BamHI-Stelle besitzt. Von diesem Zwischenkonstrukt wurde dann der Parvovirus-Anteil als BclI und BamHI-Fragment isoliert und in die BamHI-Stelle eines Bakulovirus-

Expressionsvektors (verwendet werden können verschiedene Konstrukte) inseriert. (Die BcII-Stelle sitzt unmittelbar vor dem translationellen Start von VP1, sie ist durch die PCR-Primer kodiert, siehe Abb. 1; der BamHI-Verdau muß partiell durchgeführt werden, da in der Parvovirus-Sequenz sich auch noch eine solche Stelle befindet.). Nach co-Transfektion des entstandenen Plasmids mit Wildtyp-Bakulovirus-DNA in eine Insekten-Zellkultur-Linie werden Zellen isoliert, die keine sogenannten "inclusion bodies" aufweisen. Aus solchen Zellen, bei denen das Bakulovirus Polyhedrin-Gen durch das VP1/2-Gen ersetzt ist, läßt sich das intrazellulär gebildete VP1 in großer Menge aufreinigen.

#### 5) Expression von VP-2:

Weiterhin wurde die Expression des kleineren B19-VP-2 mittels rekombinanter Bakuloviren erhalten. Hierfür wurde das VP-2-kodierende Plasmid pUC12VP (siehe Beispiel 1) mit EcoRI und HindIII verdaut und das resultierende 1,7kb Fragment in einen oben erwähnten Vektor inseriert, der neben der HindIII-Stelle noch eine BamHI-Stelle besitzt. Von diesem Zwischenkonstrukt wurde dann der Parvovirus-Anteil als BcII und BamHI-Fragment isoliert und in die BamHI-Stelle eines Bakulovirus-Expressionsvektors (verwendet werden können verschiedene Konstrukte) inseriert. (Die BcII-Stelle sitzt unmittelbar vor dem translationellen Start von VP2, sie ist durch die PCR-Primer kodiert, siehe Abb. 1, O-3; der BamHI-Verdau muß partiell durchgeführt werden, da in der Parvovirus-Sequenz sich auch noch eine solche Stelle befindet). Nach co-Transfektion des entstandenen Plasmids mit Wildtyp-Bakulovirus-DNA in eine Insekten-Zellkultur-Linie werden Zellen isoliert, die keine sogenannten "inclusion bodies" aufweisen. Aus solchen Zellen, bei denen das Bakulovirus Polyhedrin-Gen durch das VP2-Gen ersetzt ist, läßt sich das VP2 in großer Menge als Partikel aufreinigen. Diese Partikel sind besonders für den Einsatz im  $\mu$ -capture-Test geeignet.

## BEISPIEL 3

## Synthetische Peptide mit immundominanten Epitopen

Aus den Reaktionsmustern der bakteriellen Expressionsprodukte (insbesonders pGEX::VP1-Fusionskonstrukte) mit Parvovirus-positiven Seren im Western Blot lässt sich die überraschende Folgerung ziehen, daß ein kurzes Fragment aus dem VP1 Anteil ausreichend ist, um alle IgG-positiven Parvoseren zu identifizieren.

Das Fragment lässt sich mit folgenden synthetisch produzierbaren Peptiden abdecken:

## PAPEP-1:

Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys  
Ala Val Tyr

## PAPEP-2:

Leu Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro  
Ser Ser

## PAPEP-3:

Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His Phe  
Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp His Pro His Ala

## PAPEP-4:

Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser Glu  
Asp Leu His Lys Pro Gly Gln Val

## PAPEP-5:

Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln Ser  
Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile His Asp Phe Arg Tyr Ser Gln Leu

## PAPEP-6:

Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu Glu Leu Leu Lys Asn Ile  
Lys Asn Glu Thr Gly Phe

## PAPEP-7:

Asn Ala Ser Glu Lys Tyr Pro Ser Met Thr Ser Val Asn Ser Ala Glu  
Ala Ser

## PAPEP-8:

Asn Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu Glu Leu Leu Lys His  
Ile Lys

Diese Antigene können in großen Mengen synthetisch problemlos hergestellt, aufgereinigt und dann im ELISA in Konzentrationen zwischen 100 - 200 ng pro Ansatz eingesetzt werden.

Auch wenn bereits mit einem der Peptide gute Ergebnisse erreicht werden können, ist die gemeinsame Verwendung von zwei oder drei Peptiden bevorzugt.

Für den Nachweis von IgG- oder IgM-Antikörpern können zum Teil unterschiedliche Peptide oder Kombinationen davon Verwendung finden.

## BEISPIEL 4

## a) Bestimmung von Serumantikörpern gegen das Parvovirus B19

Mit den in Beispiel 2 beschriebenen und gereinigten Antigenen wurde eine größere Menge an Seren auf ihre Reaktivität mit diesen Antigenen getestet. Dabei wurden die verschiedenen rekombinanten Proteine in einer Konzentration von 0,5 - 1 µg/ml in Carbonatpuffer, pH 9,5, in die Näpfe kommerziell erhältlicher ELISA-Platten für 16h zum Anbinden gegeben. Nach dem Abwaschen von nicht-gebundenem Material können diese Platten dann im getrockneten Zustand bei 4°C gelagert werden.

Die Inkubation mit den Seren für 2h erfolgte in einer Verdünnung von 1:100, die anschließenden Waschprozeduren und der Nachweis

gebundener Antikörper mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-human-IgG Antikörper erfolgte nach üblichen Testprozeduren.

Getestet wurden verschiedene Serumpanels auf anti-B19-IgG:

1. Seren eines Patienten mit akuter B19-Infektion wurden konsekutiv ab Auftreten des Erythema infektiosum bis 19 Wochen nach der Erkrankung untersucht.

**Ergebnis:**

Sowohl mit dem Fusionsprotein aus pGEX1PAN (PCE, siehe Beispiel 2) und mit einem durch BrCN abgespaltenen VP-1 Bereich (PAN-1, siehe Beispiel 2) und auch mit einem durch Thrombin abgespaltenen VP1-Anteil (PAN-4) als Antigene wurden alle Seren bereits ab Beginn der klinischen Manifestation als anti-B19-IgG positiv erkannt und blieben über den Beobachtungszeitraum (19 Wochen) positiv.

2. Auf anti-B19-IgG wurden Serumpaare von Schwangeren (n=21) getestet, denen bei Hospitalisierung und vier Wochen später eine Serumprobe entnommen wurde. Es wurden für jedes Antigen dieselben Testseren verwendet.

**Ergebnis:**

**PCE:**

Von den 21 Schwangeren waren 15 zum Zeitpunkt der Hospitalisierung anti-B19 negativ, 6 Frauen anti-B19-IgG positiv. Das serologische Ergebnis der Zweitserumprobe vier Wochen später ergab ein identisches Ergebnis.

**PAN-2:**

Von den 21 Schwangeren waren 14 zum Zeitpunkt der Hospitalisierung anti-B19-IgG negativ, 7 Frauen anti-B19 positiv. Bei der Retestung von Serumproben, die vier Wochen später diesen Frauen abgenommen wurden, ließen sich bei einer Frau, die zuvor anti-B19-IgG positiv war, kein IgG mehr nachweisen.

**PAN-4:**

Von den 21 Schwangeren waren 15 zum Zeitpunkt der Hospitalisierung anti-B19 negativ, 6 Frauen anti-B19-IgG positiv. Das serologische Ergebnis der Zweitserumprobe vier Wochen später ergab ein identisches Ergebnis.

b) Austestung einer definiert B19 IgG/M-positiv/negativen Serum-Sammlung (n=13)

Die verwendeten Seren stammten von klinisch definierten Fällen und waren zuvor in einem IgG/M-Test überprüft worden, der gereinigtes Virus als Antigen verwendet. Seren 1-6: anti-B19 negativ, 7-9: IgM/IgG-positiv, 10-13; IgM-negativ, IgG-positiv.

Getestet wurden PAN-4 nach der oben beschriebenen Prozedur. Die Bestimmung der IgM-Antikörper erfolgte nach demselben Testprinzip wie bei der IgG-Bestimmung, jedoch wurden als Antigene PANSE und PAV-1-B in einer 1:1 Mischung mit einer 10-fach höheren Konzentration an die Platten gebunden, weiterhin erfolgte eine Elimination der Serum IgG-Antikörper durch Prä-Adsorption mit Protein A-gekoppelten Kugeln.

Folgende Absorptionswerte wurden erhalten:

IgG-Bestimmung mit PAN-4 (ca. 20ng pro Testnapf), -IgM mit einer 1:1 Mischung aus PANSE und PAV-1-B (ca. 150ng pro Testnapf Gesamtprotein)

Serum	IgG	IgM
1	0,09	0,07
2	0,05	0,06
3	0,10	0,08
4	0,07	0,06
5	0,07	0,08
6	0,04	0,07

7	1,82	1,53
8	0,90	0,46
9	0,72	0,56
10	1,10	0,08
11	0,62	0,14
12	0,98	0,11
13	0,87	0,09

Die Ergebnisse zeigen eine klare Diskrimination der positiven/negativen Seren sowohl für den IgG- als auch für den IgM-Test.

Die verwendeten IgM-positiven Seren stammten von klinisch definierten Fällen und waren zuvor in einem IgM-Test überprüft worden, der gereinigtes Virus als Antigen verwendet. Ein Testansatz mit rekombinanten Antigenen aus dem VP1 und VP2 Bereich erkannte auch alle IgM-positiven Seren. Es zeigte sich, daß die VP2-Anteile "PAPST, VP2 aber besonders PANSE" hier besser reaktiv als im IgG-Test sind. In einem kommerziellen Testkit für IgM werden deshalb beide Bereiche vertreten sein.

Eine weitere Verbesserung der Sensitivität läßt sich durch selektives Anbinden der Serum-IgM-Antikörper an die feste Phase mittels monoklonaler Antikörper, Zugabe von rekombinantem Antigen (Baculovirus-exprimiertes, partikuläres VP-2) sowie der Bestimmung der Anbindung erzielen ( $\mu$ -capture assay).

Diese Versuche belegen die hohe Zuverlässigkeit des unter Verwendung der erfundungsgemäßen immunologisch aktiven Polypeptide durchgeführten Testes.

Der VP2-Bereich, enthalten in dem "PANSE, PAPST und VP-2" benannten Antigenen bringt für die Bestimmung von Antikörpern aus Patienten mit lang abgelaufener Infektion keine zusätzliche Steigerung der Sensitivität. Eine gute Reaktion mit diesen

Antigenen dagegen ist bei Seren mit erst kurz zurückliegender Infektion zu finden. Deshalb ist dieses Antigen geeignet, eine Aussage über den Zeitpunkt der Infektion zu machen.

In einem Testkit kann eines oder eine Mischung dieser Antigene entweder zu den gentechnologisch erzeugten VP1-Anteilen bzw. zum synthetischen Peptid zugemischt werden, oder aber in getrennten Ansätzen verwendet werden, wo die Diskriminierung der Reaktivität gegen diese beiden Bereiche eine zusätzliche Aussage über den Infektionszeitpunkt erlaubt.

Eine weitere Verbesserung der Sensitivität lässt sich durch ein selektives Anbinden der Serum-IgM-Antikörper an die feste Phase mittels monoklonaler Antikörper, Zugabe von rekombinantem Antigen sowie der Bestimmung der Anbindung erzielen ( $\mu$ -capture assay).

#### Beispiel 5

Verwendung B19-spezifischer DNA-Primer für den direkten Erregernachweis

Eventuell vorhandene B19-DNA wurden aus den Untersuchungsproben (Serum, Biopsien) durch Proteinase K-Verdau in Gegenwart von 1% SDS (2h, 37°C), Phenol-Extraktion und Fällung in 70% Ethanol gewonnen. Diese und auch die dann folgende DNA-Amplifizierung wurde analog zu der in Beispiel 1 beschriebenen Prozedur durchgeführt. Verwendet wurden Primer O-5 und O-2 (Sequenz und Lage auf dem B19-Genom siehe Abb. 1); bei B19-positiven Proben besitzt das amplifizierte Fragment eine Größe von 319bp. Der Nachweis der B19-Spezifität des DNA-Fragments erfolgte nach Auftrennung der PCR-Ansätze durch ein 1,5%iges Agarose-Gel, Transfer der DNA auf eine Nitrozellulose-Membran (Southern Blot) und Hybridisierung mit einem dazwischen-liegenden DNA-Stück, das

entweder radioaktiv mit  $^{32}P$  oder Digoxigenin mittels konventioneller Methoden (primer extension) markiert worden war. Das zur Hybridisierung verwendete DNA-Fragment wurde auf folgende Art gewonnen: Aus dem Plasmid pUC12PAN wurde nach Verdau mit HincII und PstI ein 260bp langes DNA-Fragment isoliert und in pUC12 in die HincII und PstI Stellen inseriert. Aus dem resultierenden Plasmid (pUC12PCRDIA) kann nun das B19-Fragment ohne die zur Amplifizierung verwendeten Sequenzen durch EcoRI/PstI-Verdau gewonnen werden und nach Markierung als Hybridisierungsprobe eingesetzt werden.

#### BESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

Abb. 1: Schematische Darstellung des VP1/2 kodierenden Bereichs von Parvovirus B19 mit den für die Amplifizierung verwendeten Primer-Sequenzen

Im oberen Teil ist der Aufbau des einzelsträngigen B19-Genoms mit den inversen Regionen an den Enden (Doppelstrang) sowie mit kodierenden Bereichen schematisch dargestellt. Im linken Bereich ist die kodierende Region für die Nicht-Strukturproteine (NS), die als Polypeptid synthetisiert und dann prozessiert werden. Der rechte Bereich kodiert für die Oberflächenproteine des viralen Kapsids (VP1/2), wobei VP1 bis auf einen zusätzlichen N-terminalen Bereich (schraffierter Balken) identisch mit VP2 (schwarzer Balken) ist. Darunter sind die Regionen der Oligodesoxynukleotide 0-1 bis 0-4 angegeben, die als Primer für die Amplifizierung (PCR) der dazwischen liegenden B19-Sequenzen verwendet wurden (0-1 und 0-2 für den VP1-Bereich, bzw 0-3 und 0-4 für VP2).

Im unteren Teil der Abbildung sind die DNA-Sequenzen der entsprechenden B19-Bereiche sowie der Oligodesoxynukleotide angegeben. Die Oligodesoxynukleotid-Sequenzen sind durch Fettdruck kenntlich gemacht, nicht-homologe Bereiche, d.h. Sequenzen, die nicht mit B19 hybridisieren, sind durch einen Zeilenabstand abgesetzt. Bei 0-1 stellen diese nicht-hybridisierenden Sequenzen Restriktionsenzym-Stellen für EcoRI

(GAATTC) und BclI (TGATCA) dar, bei O-3 für EcoRI, BclI und BspHII (TC-ATGA), bei O-4 für HindIII (AAGCT-T). Das amplifizierte VP2 kodierende Fragment (O-3 und O-4) wurde vor dem Einsetzen in pUC-Vektoren mit EcoRI und HindIII verdaut, das VP1 kodierende Fragment mit EcoRI und PstI, wobei die PstI-Schnittstelle in der B19-DNA liegt (ab Position-Nr. 4 der angegebenen Sequenz für O-2, CTGCAG).

Abb. 2 Aminosäure-Sequenzen der in Beispiel 2 beschriebenen Antigene, die rekombinant in E.coli-Zellen produziert werden.

Bedingt durch Klonierungsschritte sind an den N-Termini sowie an den C-Termini (bis auf PANSE UND VP-2) jeweils einige nicht-B19-authentische Fremdaminosäuren mit enthalten, die durch Fettdruck hervor gehoben sind.

Beschrieben werden die Aminosäuresequenzen der in Beispiel 2 beschriebenen Antigene:

Abb. 2-1: PAN-1

Abb. 2-2: PCE

Abb. 2-3: PAN-2

Abb. 2-4: PAN-3

Abb. 2-5: PAN-4

Abb. 2-6: VP2

Abb. 2-7: PANSE

Abb. 2-8: PAPST

Abb. 2-9: PAV-1B

Abb. 2-10: PAV-1N

Abb. 3: Schematische Darstellung der Anordnung einiger Peptide zueinander

NS

VP-1/2

0-1 0-5 0-2

0-3

0-4

0-1:

5' GTG AAT TCT GAT CAT

ATG AGT AAA AAA AGT GGC AAA TGG<sup>3'</sup>5' AAA GCT TTG TAG ATT ATG AGT AAA AAA AGT GGC AAA TGG TGG<sup>3'</sup>3' TTT CGA AAC ATC TAA TAC TCA TTT TTT TCA CCG TTT ACC ACC<sup>5'</sup>

0-2:

5' ATT CTG CAG AAG CCA GCA CTG GTG CAG GAG GGG GGG GCA<sup>3'</sup>3' TAA GAC GTC TTC GGT CGT GAC CAC GTC CTC CCC CCC CGT<sup>5'</sup>3' C TTC GGT CGT GAC CAC GTC CTC CCC<sup>5'</sup>

0-3:

5' G AGG AAT TCT CTG ATC

ATG ACT TCA GTT AAT TCT GCA GAA GCC<sup>3'</sup>5' A GAA AAA TAC CCA AGC ATG ACT TCA GTT AAT TCT GCA GAA GCC<sup>3'</sup>3' T CTT TTT ATG GGT TCG TAC TGA AGT CAA TTA AGA CGT CTT CGG<sup>5'</sup>

0-4:

5' TTG TAA ACA CTC CCC ACC GTG CCC TCA GCC AGG ATG CGT A<sup>3'</sup>3' AAC ATT TGT GAG GGG TCC CAC GGG AGT CGG TCC TAC GCA T<sup>5'</sup>

3' GAG GGG TGG CAC GGG AGT CGG TCC T

TC GAA GAG<sup>5'</sup>

0-5

5' G CTA CAA GCT GGG CCC CCG CAA AG<sup>3'</sup> -----5' GAG CTA CAA GCT GGG CCC CCG CAA AGT GCT GTT GAC AGT GCT<sup>3'</sup>3' CAC GAT GTT CGA CCC GGG GGC GTT TCA CGA CAA CTG TCA CGA<sup>5'</sup>

Abb. 2

Abb. 2-1

PAN-1:

Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys Ala Val Tyr Glu Glu Phe Val Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly Thr Asp Leu Glu Leu Ile Glu Ile Leu Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala Arg Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His Phe Glu Ser His Gly Glu Leu Ser Asp His Pro His Ala Leu Ser Ser Ser His Ala Leu Ser Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Glu Val Ser Val Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Ala Gly Pro Pro Glu Val Ser Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile His Asp Phe Arg Tyr Ser Glu Leu Ala Lys Leu Gly Ile Asn Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn Glu Thr Gly Phe Glu Ala Glu Val Val Lys Asp Tyr Phe Thr Leu Lys Gly Ala Ala Ala Pro Val Ala His Phe Glu Gly Ser Leu Pro Glu Val Pro Ala Tyr Asn Ala Ser Glu Lys Tyr Pro Ser

Abb. 2-2

PCE:

Glutathione-S-Transferase - His Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys Ala Val Tyr Glu Glu Phe Val Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly Thr Asp Leu Glu Leu Ile Glu Ile Leu Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala Arg Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His Phe Glu Ser His Gly Glu Leu Ser Asp His Pro His Ala Leu Ser Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Glu Val Ser Val Glu Leu Pro Gly Thr Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Glu Ala Gly Pro Pro Glu Ser Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile His Asp Phe Arg Tyr Ser Glu Leu Ala Lys Leu Gly Ile Asn Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn Glu Thr Gly Phe Glu Ala Glu Val Val Lys Asp Tyr Phe Thr Leu Lys Gly Ala Gly Glu Phe Ile Val Thr Asp

Abb. 2-3

PAN-2

Gly Ser Arg Arg Pro Asp His Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys Ala Val Tyr Glu Glu Phe Val Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly Thr Asp Leu Glu Leu Ile Glu Ile Leu Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala Arg Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His Phe Glu Ser His Gly Glu Leu Ser Asp His Pro His Ala Leu Ser Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Glu Val Ser Val Glu Leu Pro Gly Thr Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Glu Ala Gly Pro Pro Glu Ser Ala Val Gly Asp Pro Arg Glu Phe Ile Val Thr Asp

Abb. 2-4

PAN-3

Gly Ile Leu Ser Arg Arg Pro Asp His Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys Ala Val Tyr Glu Glu Phe Val Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly Thr Asp Leu Glu Leu Ile Glu Ile Leu Lys Asp His Tyr Asp Ile Ser Leu Asp Asp Pro Leu Glu Asp Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala Arg Ile Lys Asp Asp Leu Lys Asp Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His Phe Glu Ser His Gly Glu Leu Ser Asp His Pro His Ala Leu Ser Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asp Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Glu Val Ser Val Glu Leu Pro Gly Thr Asp Tyr Val Gly Pro Gly Asp Glu Leu Glu Ala Gly Pro Pro Glu Ser Ala Val Gly Asp Pro Leu Glu Asp Pro Arg Val Pro Ser Ser Asp Ser

Abb. 2-5

PAN-4

Gly Ser Arg Arg Pro Asp His Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys Ala Val Tyr Glu Glu Phe Val Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly Thr Asp Leu Glu Leu Ile Glu Ile Leu Lys Asp His Tyr Asp Ile Ser Leu Asp Asp Pro Leu Glu Asp Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala Arg Ile Lys Asp Asp Leu Lys Asp Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His Phe Glu Ser His Gly Glu Leu Ser Asp His Pro His Ala Leu Ser Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asp Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Glu Val Ser Val Glu Leu Pro Gly Thr Asp Tyr Val Gly Pro Gly Asp Glu Leu Glu Ala Gly Pro Pro Glu Ser Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile His Asp Phe Arg Tyr Ser Glu Leu Ala Lys Leu Gly Ile Asp Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu Glu Leu Leu Lys Asp Ile Lys Asp Glu Thr Gly Phe Glu Ala Glu Val Val Lys Asp Tyr Phe Thr Leu Lys Gly Ala Ala Pro Val Ala His Phe Glu Gly Ser Leu Pro Glu Val Pro Ala Tyr Asp Ala Ser Glu Lys Tyr Pro Ser Met Thr Ser Val Asp Ser Ala Gly Arg Arg Ile Pro Gly Asp Ser Ser

Abb. 2-6

VP2:

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ile Met Thr Ser Val Asp Ser Ala Glu Ala Ser Thr Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ser Val Lys Ser Met Trp Ser Glu Gly Ala Thr Phe Ser Ala Asp Ser Val Thr Cys Thr Phe Ser Arg Glu Phe Leu Ile Pro Tyr Asp Pro Glu His His Tyr Lys Val Phe Ser Pro Ala Ala Ser Ser Cys His Asp Ala Ser Gly Lys Glu Ala Lys Val Cys Thr Ile Ser Pro Ile Met Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Arg Tyr Leu Asp Phe Asp Ala Ala Leu Asp Leu Phe Phe Ser Pro Leu Glu Phe Glu His Leu Ile Glu Asp Tyr Gly Ser Ile Ala Pro Asp Ala Leu Thr Val Thr Ile Ser Glu Ile Ala Val Lys Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Gly Val Glu Val Thr Asp Ser Thr Thr Gly Arg Leu Cys Met Leu Val Asp His Glu Tyr Lys Tyr Pro Tyr Val Leu Gly Glu Gly Glu Asp Thr Leu Ala Pro Glu Leu Pro Ile Trp Val Tyr Phe Pro Pro Glu Tyr Ala Tyr Leu Thr Val Gly Asp Val Asp Thr Glu Gly Ile Ser Gly Asp Ser Lys Lys Leu Ala Ser Glu Glu Ser Ala Phe Tyr Val Leu Glu His Ser Ser Phe Glu Leu Leu Gly Thr Gly Thr Ala Ser Met Ser Tyr Lys Phe Pro Pro Glu Asp Leu Glu Gly Cys Ser Glu His Phe Tyr Glu Met Tyr Asp Pro Leu Tyr Gly Ser Arg Leu Gly Val Pro Asp Thr Leu Gly Gly Asp Pro Lys Phe Arg Ser Leu Thr His Glu Asp His Ala Ile Glu Pro Glu Asp Phe Met Pro Gly Pro Leu Val Asp Ser Val Ser Thr Lys Glu Gly Asp Ser Ser Asp Thr Gly Ala Gly Lys Ala Leu Thr Gly Leu Ser Thr Gly Thr Ser Glu Asp Thr Arg Ile Ser Leu Arg Pro Gly Pro Val Ser Glu Pro Tyr His His Trp Asp Thr Asp Lys Tyr Val Thr Gly Ile Asp Ala Ile Ser His Gly Glu Thr Thr Tyr Gly Asp Ala Glu Asp Lys Glu Tyr Glu Glu Gly Val Gly Arg Phe Pro Asp Glu Lys Glu Glu Leu Lys Glu Leu Glu Gly Leu Asp Met His Thr Tyr Phe Pro Asp Lys Glu Thr Glu Glu Tyr Thr Asp Glu Ile Glu Arg Pro Leu Met Val Gly Ser Val Trp Asp Arg Arg Ala Leu His Tyr Glu Ser Glu Leu Trp Ser Lys Ile Pro Asp Leu Asp Asp Ser Phe Lys Thr Glu Phe Ala Ala Leu Gly Gly Thr Gly Leu His Glu Pro Pro Glu Ile Phe Leu Lys Glu Tyr Ala Val Gly Ile Met Thr Val Thr Met Thr Phe Lys Leu Gly Pro Arg Lys Ala Thr Gly Arg Trp Asp Pro Glu Pro Gly Val Tyr Pro Pro His Ala Ala Gly His Leu Pro Tyr Val Leu Tyr Asp Pro Thr Ala Thr Asp Ala Lys Glu His His Arg His Gly Tyr Glu Lys Pro Glu Glu Leu Trp Thr Ala Lys Ser Arg Val His Pro Leu

Abb. 2.7

PANSE:

Met Thr Met Ile Thr Pro Ser Leu His Ala Cys Met Leu Val Asp His Glu Tyr Lys Tyr Pro Tyr Val Leu Gly  
 Glu Gly Gln Asp Thr Leu Ala Pro Glu Leu Pro Ile Trp Val Tyr Phe Pro Pro Gln Tyr Ala Tyr Leu Thr Val  
 Gly Asp Val Asn Thr Gln Gly Ile Ser Gly Asp Ser Lys Lys Leu Ala Ser Glu Glu Ser Ala Phe Tyr Val Leu  
 Glu His Ser Ser Phe Gln Leu Leu Gly Thr Gly Thr Ala Ser Met Ser Tyr Lys Phe Pro Pro Val Pro Pro  
 Glu Asn Leu Glu Gly Cys Ser Gln His Phe Tyr Glu Met Tyr Asn Pro Leu Tyr Gly Ser Arg Leu Gly Val Pro  
 Asp Thr Leu Gly Gly Asp Pro Lys Phe Arg Ser Leu Thr His Glu Asp His Ala Ile Gln Pro Gln Asn Phe Met  
 Pro Gly Pro Leu Val Asn Ser Val Ser Thr Lys Glu Gly Asp Ser Ser Asn Thr Gly Ala Gly Lys Ala Leu Thr  
 Gly Leu Ser Thr Gly Thr Ser Gln Asn Thr Arg Ile Ser Leu Arg Pro Gly Pro Val Ser Gln Pro Tyr His His  
 Trp Asp Thr Asp Lys Tyr Val Thr Gly Ile Asn Ala Ile Ser His Gly Gln Thr Thr Tyr Gly Asn Ala Glu Asp  
 Lys Glu Tyr Gln Gln Gly Val Gly Arg Phe Pro Asn Glu Lys Glu Gln Leu Lys Gln Leu Gln Gly Leu Asn  
 Met His Thr Tyr Phe Pro Asn Lys Gly Thr Gln Gln Tyr Thr Asp Gln Ile Glu Arg Pro Leu Met Val Gly Ser  
 Val Trp Asn Arg Arg Ala Leu His Tyr Glu Ser Gln Leu Trp Ser Lys Ile Pro Asn Leu Asp Asp Ser Phe Lys  
 Thr Gln Phe Ala Ala Leu Gly Gly Trp Gly Leu His Gln Pro Pro Gln Ile Phe Leu Lys Gln Tyr Ala Val  
 Gly Ile Met Thr Val Thr Met Thr Phe Lys Leu Gly Pro Arg Lys Ala Thr Gly Arg Trp Asn Pro Gln Pro Gly  
 Val Tyr Pro Pro His Ala Ala Gly His Leu Pro Tyr Val Leu Tyr Asp Pro Thr Ala Thr Asp Ala Lys Gln His  
 His Arg His Gly Tyr Glu Lys Pro Glu Glu Leu Trp Thr Ala Lys Ser Arg Val His Pro Leu

Abb. 2.8

PAPST:

Met Thr Met Ile Thr Pro Ser Leu Ala Ala Glu Ala Ser Thr Gly Ala Gly Gly Gly Ser Asn Ser Val Lys  
 Ser Met Trp Ser Glu Gly Ala Thr Phe Ser Ala Asn Ser Val Thr Cys Thr Phe Ser Arg Gln Phe Leu Ile Pro  
 Tyr Asp Pro Glu His His Tyr Lys Val Phe Ser Pro Ala Ala Ser Ser Cys His Asn Ala Ser Gly Lys Glu Ala  
 Lys Val Cys Thr Ile Ser Pro Ile Met Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Arg Tyr Leu Asp Phe Asn Ala Leu Asn Leu  
 Phe Phe Ser Pro Leu Glu Phe Gln His Leu Ile Glu Asn Tyr Gly Ser Ile Ala Pro Asp Ala Ley Thr Val Thr  
 Ile Ser Glu Ile Ala Val Lys Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Gly Val Gln Val Thr Asp Ser Thr Thr Gly  
 Arg Leu Cys Met Leu Val Asp His Glu Tyr Lys Tyr Pro Tyr Val Leu Gly Gln Gln Asp Thr Leu Ala Pro  
 Glu Leu Pro Ile Trp Val Tyr Phe Pro Pro Glu Tyr Ala Tyr Leu Thr Val Gly Asp Val Asn Thr Gln Gly Ile  
 Ser Gly Asp Ser Lys Lys Leu Ala Ser Glu Glu Ser Ala Phe Tyr Val Leu Glu His Ser Ser Phe Gln Leu Leu  
 Gly Thr Gly Gly Thr Ala Ser Met Ser Tyr Lys Phe Pro Pro Val Pro Pro Glu Asn Leu Glu Gly Cys Arg Ser  
 Thr Asp Pro Arg Glu Phe Thr Gly Arg Arg Phe Thr Thr Ser

Abb. 2-9

PAV-1-B

Met Thr Ile Thr Asn Ser Asp His Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys  
 Ala Val Tyr Gln Gln Phe Val Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly Thr Asp Leu Glu Leu Ile Gln Ile Leu Lys  
 Asp His Tyr Asn Ile Ser Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala Arg Ile Lys  
 Asn Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp His Pro His  
 Ala Leu Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu His Lys  
 Pro Gly Gln Val Ser Val Gln Leu Pro Gly Thr Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gln Ala Gly Pro Pro  
 Gln Ser Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile His Asp Phe Arg Tyr Ser Gln Leu Ala Lys Leu Gly Ile Asn Pro  
 Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu Glu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn Glu Thr Gly Phe Gln Ala Gln Val  
 Val Lys Asp Tyr Phe Thr Leu Lys Gly Ala Ala Ala Pro Val Ala His Phe Gln Gly Ser Leu Asn Ser Val Thr Cys Thr Phe  
 Ala Tyr Asn Ala Ser Glu Lys Tyr Pro Ser Ala Asn Ser Val Gln Ala Gly Gly Ser Asn Ser Val Thr Cys Thr Phe  
 Ser Arg Gln Phe Leu Ile Pro Tyr Asp Pro Glu His His Tyr Lys Val Phe Ser Pro Ala Ala Ser Ser Cys His  
 Asn Ala Ser Gly Lys Glu Ala Lys Val Cys Thr Ile Ser Pro Ile Met Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Arg Tyr Leu Asp  
 Phe Asn Ala Leu Asn Leu Phe Ser Pro Leu Glu Phe Gln His Leu Ile Glu Asn Tyr Gly Ser Ile Ala Pro  
 Asp Ala Leu Thr Val Thr Ile Ser Glu Ile Ala Val Lys Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Gly Val Gln Val  
 Thr Asp Ser Thr Thr Gly Arg Leu Cys Met Leu Val Asp His Glu Tyr Lys Tyr Pro Tyr Val Leu Gly Gln Gly  
 Gln Asp Thr Leu Ala Pro Glu Leu Pro Ile Trp Val Tyr Phe Pro Pro Gln Tyr Ala Tyr Leu Thr Val Gly Asp  
 Val Asn Thr Gln Gly Ile Ser Gly Asp Ser Lys Lys Leu Ala Ser Glu Glu Ser Ala Phe Tyr Val Leu Glu His  
 Ser Ser Phe Gln Leu Leu Gly Thr Gly Gly Thr Ala Ser Met Ser Tyr Lys Phe Pro Pro Val Pro Pro Glu Asn  
 Leu Glu Gly Cys Ser Gln His Phe Tyr Glu Met Tyr Asn Pro Leu Tyr Gly Ser Ser Arg Val Asp Leu Gln

Abb.2-10

PAV-1-N

Met Thr Ile Thr Asn Ser Asp His Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys  
 Ala Val Tyr Gln Gln Phe Val Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly Thr Asp Leu Glu Leu Ile Gln Ile Leu Lys  
 Asp His Tyr Asn Ile Ser Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala Arg Ile Lys  
 Asn Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp His Pro His  
 Ala Leu Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu His Lys  
 Pro Gly Gln Val Ser Val Gln Leu Pro Gly Thr Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gln Ala Gly Pro Pro  
 Gln Ser Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile His Asp Phe Arg Tyr Ser Gln Leu Ala Lys Leu Gly Ile Asn Pro  
 Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu Glu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn Glu Thr Gly Phe Gln Ala Gln Val  
 Val Lys Asp Tyr Phe Thr Leu Lys Gly Ala Ala Ala Pro Val Ala His Phe Gln Gly Ser Leu Pro Glu Val Pro  
 Ala Tyr Asn Ala Ser Glu Lys Tyr Pro Ser Met Thr Ser Val Asn Ser Ala Glu Ala Ser Thr Gly Ala Gly Gly  
 Gly Ser Asn Ser Val Lys Ser Met Trp Ser Glu Gly Ala Thr Phe Ser Ala Asn Ser Val Thr Cys Thr Phe  
 Ser Arg Gln Phe Leu Ile Pro Tyr Asp Pro Glu His His Tyr Lys Val Phe Ser Pro Ala Ala Ser Ser Cys His  
 Asn Ala Ser Gly Lys Glu Ala Lys Val Cys Thr Ile Ser Pro Ile Met Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Arg Tyr Leu Asp  
 Phe Asn Ala Leu Asn Leu Phe Ser Pro Leu Glu Phe Gln His Leu Ile Glu Asn Tyr Gly Ser Ile Ala Pro  
 Asp Ala Leu Thr Val Thr Ile Ser Glu Ile Ala Val Lys Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Gly Val Gln Val  
 Thr Asp Ser Thr Thr Gly Arg Leu Cys Ser Asn

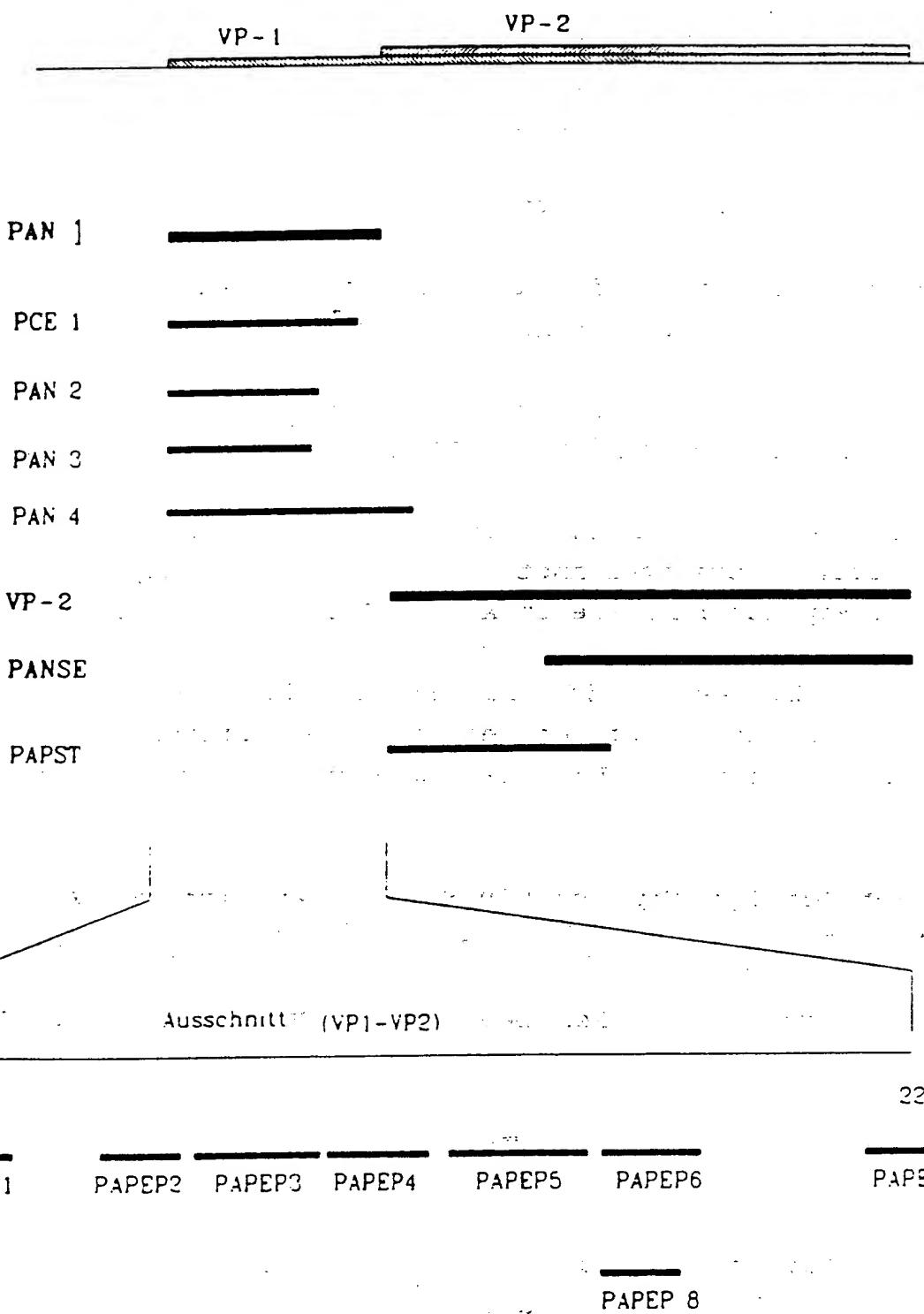


Abb. 3

**ERSATZBLATT**

## PATENTANSPRÜCHE

1. Immunologisch aktives Peptid oder Polypeptid, das einen Teil der Aminosäuresequenz der Kapsidproteine VP1 oder VP2 des Parvovirus B19 aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß es frei ist von Verunreinigungen, die den Nachweis von Parvovirus B19 spezifischen Antikörpern stören können.
2. Immunologisch aktives Peptid oder Polypeptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es 8 bis 50 Aminosäuren aufweist.
3. Immunologisch aktives Peptid oder Polypeptid nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es 10 bis 32 Aminosäuren aufweist.
4. Immunologisch aktives Peptid oder Polypeptid nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid eine Teilsequenz des Peptids PAN1 wie in Abb. 2-1 dargestellt ist.
5. Immunologisch aktives Peptid oder Polypeptid nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz Asn Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu Glu Leu Leu Lys His Ile Lys und/oder  
  
Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys Ala Val Tyr und/oder  
  
Leu Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser und/oder  
  
Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp His Pro His Ala und/oder  
  
Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Gln Val und/oder

Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln Ser  
Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile His Asp Phe Arg Tyr Ser Gln Leu  
und/oder

Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu Glu Leu Leu Lys Asn Ile  
Lys Asn Glu Thr Gly Phe und/oder

Asn Ala Ser Glu Lys Tyr Pro Ser Met Thr Ser Val Asn Ser Ala Glu  
Ala Ser aufweist.

6. Immunologisch aktives Peptid oder Polypeptid nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz

His Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe  
Ala Lys Ala Val Tyr Gln Gln Phe Val Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr  
Gly Thr Asp Leu Glu Leu Ile Gln Ile Leu Lys Asp His Tyr Asn Ile  
Ser Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val  
Ala Arg Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His  
His Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp His Pro His Ala Leu Ser  
Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser  
Ser Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Gln Val Ser Val Gln Leu Pro Gly  
Thr Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln  
Ser Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile His Asp Phe Arg Tyr Ser Gln  
Leu Ala Lys Leu Gly Ile Asn Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp  
Glu Glu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn Glu Thr Gly Phe Gln Ala Gln  
Val Val Lys Asp Tyr Phe Thr Leu Lys Gly Ala Gly Glu Phe Ile Val  
Thr Asp und/oder

Gly Ser Arg Arg Pro Asp His Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp Trp  
Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys Ala Val Tyr Gln Gln Phe Val Glu  
Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly Thr Asp Leu Glu Leu Ile Gln Ile Leu  
Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser  
Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala Arg Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asn Ser  
Pro Asp Leu Tyr Ser His His Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp  
His Pro His Ala Leu Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly  
Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Gln Val  
Ser Val Gln Leu Pro Gly Thr Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu

Gln Ala Gly Pro Pro Gln Ser Ala Val Gly Asp Pro Arg Glu Phe Ile  
Val Thr Asp und/oder

Gly Ile Leu Ser Arg Arg Pro Asp His Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys  
Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys Ala Val Tyr Gln Gln Phe  
Val Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly Thr Asp Leu Glu Leu Ile Gln  
Ile Leu Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn  
Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala Arg Ile Lys Asn Asn Leu Lys  
Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His Phe Gln Ser His Gly Gln Leu  
Ser Asp His Pro His Ala Leu Ser Ser Ser Ser His Ala Glu Pro  
Arg Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu His Lys Pro Gly  
Gln Val Ser Val Gln Leu Pro Gly Thr Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn  
Glu Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln Ser Ala Val Gly Asp Pro Leu Glu  
Asp Pro Arg Val Pro Ser Ser Asn Ser und/oder

Gly Ser Arg Arg Pro Asp His Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp Trp  
Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys Ala Val Tyr Gln Gln Phe Val Glu  
Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly Thr Asp Leu Glu Leu Ile Gln Ile Leu  
Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser  
Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala Arg Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asn Ser  
Pro Asp Leu Tyr Ser His His Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp  
His Pro His Ala Leu Ser Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly  
Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Gln Val  
Ser Val Gln Leu Pro Gly Thr Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu  
Gln Ala Gly Pro Pro Gln Ser Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile His  
Asp Phe Arg Tyr Ser Gln Leu Ala Lys Leu Gly Ile Asn Pro Tyr Thr  
His Trp Thr Val Ala Asp Glu Glu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn Glu  
Thr Gly Phe Gln Ala Gln Val Val Lys Asp Tyr Phe Thr Leu Lys Gly  
Ala Ala Ala Pro Val Ala His Phe Gln Gly Ser Leu Pro Glu Val Pro  
Ala Tyr Asn Ala Ser Glu Lys Tyr Pro Ser Met Thr Ser Val Asn Ser  
Ala Gly Arg Arg Ile Pro Gly Asn Ser Ser und/oder

Met Thr Met Ile Thr Pro Ser Leu His Ala Cys Met Leu Val Asp His  
Glu Tyr Lys Tyr Pro Tyr Val Leu Gly Gln Gly Gln Asp Thr Leu Ala  
Pro Glu Leu Pro Ile Trp Val Tyr Phe Pro Pro Gln Tyr Ala Tyr Leu  
Thr Val Gly Asp Val Asn Thr Gln Gly Ile Ser Gly Asp Ser Lys Lys  
Leu Ala Ser Glu Glu Ser Ala Phe Tyr Val Leu Glu His Ser Ser Phe

Gln Leu Leu Gly Thr Gly Gly Thr Ala Ser Met Ser Tyr Lys Phe Pro  
Pro Val Pro Pro Glu Asn Leu Glu Gly Cys Ser Gln His Phe Tyr Glu  
Met Tyr Asn Pro Leu Tyr Gly Ser Arg Leu Gly Val Pro Asp Thr Leu  
Gly Gly Asp Pro Lys Phe Arg Ser Leu Thr His Glu Asp His Ala Ile  
Gln Pro Gln Asn Phe Met Pro Gly Pro Leu Val Asn Ser Val Ser Thr  
Lys Glu Gly Asp Ser Ser Asn Thr Gly Ala Gly Lys Ala Leu Thr Gly  
Leu Ser Thr Gly Thr Ser Gln Asn Thr Arg Ile Ser Leu Arg Pro Gly  
Pro Val Ser Gln Pro Tyr His His Trp Asp Thr Asp Lys Tyr Val Thr  
Gly Ile Asn Ala Ile Ser His Gly Gln Thr Thr Tyr Gly Asn Ala Glu  
Asp Lys Glu Tyr Gln Gln Gly Val Gly Arg Phe Pro Asn Glu Lys Glu  
Gln Leu Lys Gln Leu Gln Gly Leu Asn Met His Thr Tyr Phe Pro Asn  
Lys Gly Thr Gln Gln Tyr Thr Asp Gln Ile Glu Arg Pro Leu Met Val  
Gly Ser Val Trp Asn Arg Arg Ala Leu His Tyr Glu Ser Gln Leu Trp  
Ser Lys Ile Pro Asn Leu Asp Asp Ser Phe Lys Thr Gln Phe Ala Ala  
Leu Gly Gly Trp Gly Leu His Gln Pro Pro Pro Gln Ile Phe Leu Lys  
Gln Tyr Ala Val Gly Ile Met Thr Val Thr Met Thr Phe Lys Leu Gly  
Pro Arg Lys Ala Thr Gly Arg Trp Asn Pro Gln Pro Gly Val Tyr Pro  
Pro His Ala Ala Gly His Leu Pro Tyr Val Leu Tyr Asp Pro Thr Ala  
Thr Asp Ala Lys Gln His His Arg His Gly Tyr Glu Lys Pro Glu Glu  
Leu Trp Thr Ala Lys Ser Arg Val His Pro Leu und/oder

Met Thr Met Ile Thr Pro Ser Leu Ala Ala Glu Ala Ser Thr Gly Ala  
Gly Gly Gly Ser Asn Ser Val Lys Ser Met Trp Ser Glu Gly Ala  
Thr Phe Ser Ala Asn Ser Val Thr Cys Thr Phe Ser Arg Gln Phe Leu  
Ile Pro Tyr Asp Pro Glu His His Tyr Lys Val Phe Ser Pro Ala Ala  
Ser Ser Cys His Asn Ala Ser Gly Lys Glu Ala Lys Val Cys Thr Ile  
Ser Pro Ile Met Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Arg Tyr Leu Asp Phe Asn  
Ala Leu Asn Leu Phe Phe Ser Pro Leu Glu Phe Gln His Leu Ile Glu  
Asn Tyr Gly Ser Ile Ala Pro Asp Ala Leu Thr Val Thr Ile Ser Glu  
Ile Ala Val Lys Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Gly Val Gln Val  
Thr Asp Ser Thr Thr Gly Arg Leu Cys Met Leu Val Asp His Glu Tyr  
Lys Tyr Pro Tyr Val Leu Gly Gln Gly Gln Asp Thr Leu Ala Pro Glu  
Leu Pro Ile Trp Val Tyr Phe Pro Pro Gln Tyr Ala Tyr Leu Thr Val  
Gly Asp Val Asn Thr Gln Gly Ile Ser Gly Asp Ser Lys Lys Leu Ala  
Ser Glu Glu Ser Ala Phe Tyr Val Leu Glu His Ser Ser Phe Gln Leu  
Leu Gly Thr Gly Gly Thr Ala Ser Met Ser Tyr Lys Phe Pro Pro Val

Pro Pro Glu Asn Leu Glu Gly Cys Arg Ser Thr Asp Pro Arg Glu Phe  
Thr Gly Arg Arg Phe Thr Thr Ser und/oder

Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala  
Lys Ala Val Tyr Gln Gln Phe Val Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly  
Thr Asp Leu Glu Leu Ile Gln Ile Leu Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser  
Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala  
Arg Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His  
Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp His Pro His Ala Leu Ser Ser  
Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser  
Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Gln Val Ser Val Gln Leu Pro Gly Thr  
Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln Ser  
Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile His Asp Phe Arg Tyr Ser Gln Leu  
Ala Lys Leu Gly Ile Asn Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu  
Glu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn Glu Thr Gly Phe Gln Ala Gln Val  
Val Lys Asp Tyr Phe Thr Leu Lys Gly Ala Ala Ala Pro Val Ala His  
Phe Gln Gly Ser Leu Pro Glu Val Pro Ala Tyr Asn Ala Ser Glu Lys  
Tyr Pro Ser und/oder

Met Thr Ile Thr Asn Ser Asp His Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp  
Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys Ala Val Tyr Gln Gln Phe Val  
Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly Thr Asp Leu Glu Leu Ile Gln Ile  
Leu Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro  
Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala Arg Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asn  
Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser  
Asp His Pro His Ala Leu Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg  
Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Gln  
Val Ser Val Gln Leu Pro Gly Thr Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu  
Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln Ser Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile  
His Asp Phe Arg Tyr Ser Gln Leu Ala Lys Leu Gly Ile Asn Pro Tyr  
Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu Glu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn  
Glu Thr Gly Phe Gln Ala Gln Val Val Lys Asp Tyr Phe Thr Leu Lys  
Gly Ala Ala Ala Pro Val Ala His Phe Gln Gly Ser Leu Pro Glu Val  
Pro Ala Tyr Asn Ala Ser Glu Lys Tyr Pro Ser Met Thr Ser Val Asn  
Ser Ala Glu Ala Ser Thr Gly Ala Gly Gly Gly Ser Asn Ser Val  
Lys Ser Met Trp Ser Glu Gly Ala Thr Phe Ser Ala Asn Ser Val Thr  
Cys Thr Phe Ser Arg Gln Phe Leu Ile Pro Tyr Asp Pro Glu His His

Tyr Lys Val Phe Ser Pro Ala Ala Ser Ser Cys His Asn Ala Ser Gly  
Lys Glu Ala Lys Val Cys Thr Ile Ser Pro Ile Met Gly Tyr Ser Thr  
Pro Trp Arg Tyr Leu Asp Phe Asn Ala Leu Asn Leu Phe Phe Ser Pro  
Leu Glu Phe Gln His Leu Ile Glu Asn Tyr Gly Ser Ile Ala Pro Asp  
Ala Leu Thr Val Thr Ile Ser Glu Ile Ala Val Lys Asp Val Thr Asp  
Lys Thr Gly Gly Val Gln Val Thr Asp Ser Thr Thr Gly Arg Leu  
Cys Met Leu Val Asp His Glu Tyr Lys Tyr Pro Tyr Val Leu Gly Gln  
Gly Gln Asp Thr Leu Ala Pro Glu Leu Pro Ile Trp Val Tyr Phe Pro  
Pro Gln Tyr Ala Tyr Leu Thr Val Gly Asp Val Asn Thr Gln Gly Ile  
Ser Gly Asp Ser Lys Lys Leu Ala Ser Glu Glu Ser Ala Phe Tyr Val  
Leu Glu His Ser Ser Phe Gln Leu Leu Gly Thr Gly Gly Thr Ala Ser  
Met Ser Tyr Lys Phe Pro Pro Val Pro Pro Glu Asn Leu Glu Gly Cys  
Ser Gln His Phe Tyr Glu Met Tyr Asn Pro Leu Tyr Gly Ser Ser Arg  
Val Asp Leu Gln und/oder

Met Thr Ile Thr Asn Ser Asp His Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp  
Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys Ala Val Tyr Gln Gln Phe Val  
Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly Thr Asp Leu Glu Leu Ile Gln Ile  
Leu Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro  
Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala Arg Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asn  
Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser  
Asp His Pro His Ala Leu Ser Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg  
Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Gln  
Val Ser Val Gln Leu Pro Gly Thr Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu  
Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln Ser Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile  
His Asp Phe Arg Tyr Ser Gln Leu Ala Lys Leu Gly Ile Asn Pro Tyr  
Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu Glu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn  
Glu Thr Gly Phe Gln Ala Gln Val Val Lys Asp Tyr Phe Thr Leu Lys  
Gly Ala Ala Ala Pro Val Ala His Phe Gln Gly Ser Leu Pro Glu Val  
Pro Ala Tyr Asn Ala Ser Glu Lys Tyr Pro Ser Met Thr Ser Val Asn  
Ser Ala Glu Ala Ser Thr Gly Ala Gly Gly Ser Asn Ser Val  
Lys Ser Met Trp Ser Glu Gly Ala Thr Phe Ser Ala Asn Ser Val Thr  
Cys Thr Phe Ser Arg Gln Phe Leu Ile Pro Tyr Asp Pro Glu His His  
Tyr Lys Val Phe Ser Pro Ala Ala Ser Ser Cys His Asn Ala Ser Gly  
Lys Glu Ala Lys Val Cys Thr Ile Ser Pro Ile Met Gly Tyr Ser Thr  
Pro Trp Arg Tyr Leu Asp Phe Asn Ala Leu Asn Leu Phe Phe Ser Pro

Leu Glu Phe Gln His Leu Ile Glu Asn Tyr Gly Ser Ile Ala Pro Asp  
Ala Leu Thr Val Thr Ile Ser Glu Ile Ala Val Lys Asp Val Thr Asp  
Lys Thr Gly Gly Val Gln Val Thr Asp Ser Thr Thr Gly Arg Leu  
Cys Ser Asn oder Teilsequenzen davon aufweist.

7. Immunologisch aktives Peptid oder Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es als Fusionsprotein vorliegt, wobei dieses Fusionsprotein wenigstens einen Teil der  $\beta$ -Galactosidase oder der Glutathion-S-Transferase aufweist.

8. Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen das humane Parvovirus B19, dadurch gekennzeichnet, daß es wenigstens ein immunologisch aktives Peptid oder Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 7 aufweist, das mit den in den Untersuchungsflüssigkeiten vorhandenen Antikörpern reagieren kann und, daß es wenigstens eine Anzeigekomponente aufweist, die den Nachweis von Komplexen aus immunologisch aktivem Peptid und Antikörper ermöglicht.

9. Testkit nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Anzeigekomponente ein gegen den nachzuweisenden Antikörper gerichteter Antikörper ist, der eine Markierung aufweist.

10. Testkit nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung in einem radioaktiven Isotop besteht.

11. Testkit nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung aus einem Enzym besteht, das eine Farbreaktion katalysieren kann.

12. Testkit nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das immunologisch aktive Peptid oder Polypeptid biotinyliert ist und die Anzeigekomponente Avidin oder Streptavidin mit daran kovalent gebundenem Enzym, insbesondere Peroxidase, ist.

13. Testkit nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß es ein ELISA-Kit ist.

14. Testkit nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens ein immunologisch aktives Peptid oder Polypeptid nach den Ansprüchen 1 bis 7 an Mikrotiterplatten gekoppelt ist und, daß die Anzeigekomponente aus anti-human IgG- und/oder IgM-Antikörpern besteht, an die ein eine Farbreaktion katalysierendes Enzym gekoppelt ist.

15. Testkit nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß monoklonale Antikörper gegen Human-IgM-Antikörper an Mikrotiterplatten gekoppelt sind und, daß die Anzeigekomponente ein biotinyliertes immunologisch aktives Peptid oder Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 7 ist, das mit Avidin oder Streptavidin mit daran kovalent gebundenem Enzym zusammenwirkt.

16. Verfahren zur Reinigung von immunologisch aktiven Peptiden oder Polypeptiden nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Abtrennung unlöslicher Bestandteile, eine Auftrennung durch eine DEAE-Sephazell-Säule und eine weitere Reinigung mittels einer Anionenaustauscher-Säule im HPLC in 8M Harnstoff umfaßt.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß es außerdem eine Affinitäts-Chromatographie umfaßt.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Affinitäts-Chromatographie mit einer Glutathion-gekoppelten Gel-Matrix erfolgt.

19. Verwendung von wenigstens einer DNA-Sequenz ausgewählt unter O-1:

GTG AAT TCT GAT CAT ATG AGT AAA AAA AGT GGC AAA TGG,

O-2:

C TTC GGT CGT GAC CAC GTC CTC CCC

O-3:

G AGG AAT TCT CTG ATC ATG ACT TCA GTT AAT TCT GCA GAA GCC

O-4:

GAG GGG TGG CAC GGG AGT CGG TCC TTC GAA GAG

O-5:

G CTA CAA GCT GGG CCC CCG CAA AG

zum direkten Erregernachweis mittels DNA-Amplifizierung, insbesondere mittels Polymerase-chain-reaction.

20. Verwendung von immunologisch aktiven Peptiden nach einem der Ansprüche 1 bis 7 als Impfstoff gegen Infektionen mit Parvovirus B19.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/DE 91/00106

## I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) \*

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC  
**Int. Cl. 5 C 07 K 7/00, C 07 K 13/00, G 01 N 33/569, G 01 N 33/68,**  
**C 07 K 3/18, C 07 K 3/22, C 07 K 3/20, C 12 N 15/10**

## II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ?

Classification System	Classification Symbols
Int. Cl. 5	C 07 K, G 01 N, C 12 N

Documentation Searched other than Minimum Documentation  
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched \*

## III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT \*

Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
P,X	Chemical Abstracts, vol. 114, No. 3, published 21 January 1991 (21.01.91) (Columbus, Ohio, USA), F.B.Rayment et al. "The production of human parvovirus capsid proteins in Escherichia coli and their potential as diagnostic antigens", see page 203, right-hand column, abstract No. 18 831d; J. Gen. Virol. 1990, 71(11), 265-72.	1,7,8
P,X	WO, Al, 88/02 026 (APPLIED BIOTECHNOLOGY, INC.), 24 March 1988 (24.03.88); see claims 5-8, 38, 42-44.	1,8
P,X	Chemical Abstracts, vol. 109, No. 17, published 24 October 1988 (24.10.88) (Columbus, Ohio, USA), K.Ozawa et al. "Translational regulation of B19 parvovirus capsid protein production by multiple upstream AUG triplets", see page 177, left-hand column, abstract No.143 557s; J. Biol. Chem. 1988, 263 (22), 10922-6	1

\* Special categories of cited documents: <sup>10</sup>

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

## IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

09 April 1991 (09.04.91)

Date of Mailing of this International Search Report

10 June 1991 (10.06.91)

International Searching Authority

EUROPEAN PATENT OFFICE

Signature of Authorized Officer

ANHANG  
zum internationalen Recherchen-  
bericht über die internationale  
Patentanmeldung Nr.

ANNEX  
to the International Search  
Report to the International Patent  
Application No.

ANNEXE  
au rapport de recherche inter-  
national relatif à la demande de brevet  
international n°

PCT/DE91/00106 SAE 44249

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obenge- nannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben. Diese Angaben dienen nur zur Unter- richtung und erfolgen ohne Gewähr.

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Office is in no way liable for these particulars which are given merely for the purpose of information.

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents de brevets cités dans le rapport de recherche international visée ci-dessus. Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument Patent document cited in search report Document de brevet cité dans le rapport de recherche	Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication	Mitglied(er) der Patentfamilie Patent family member(s) Membre(s) de la familie de brevets	Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication
WO-A1- 8802026	24-03-88	AU-A1-79669/87 EP-A1- 322417 JP-T2- 1503675	07-04-88 05-07-89 14-12-89

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

### Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 91/00106

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC  
Int.CI 5 C 07 K 7/00, C 07 K 13/00, G 01 N 33/569, G 01 N 33/68,  
Int.CI 5 C 07 K 3/18, C 07 K 3/22, C 07 K 3/20, C 12 N 15/10

## II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE

### Recherchiertes Mindestpräfatoit<sup>7</sup>

Klassifikationszyklen

Int.Cl. 5 C 07 K,G 01 N,C 12 N

Recherchierte nicht zum Mindestarbeitsstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen.<sup>3</sup>

### III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN

Art\* Kennzeichnung der Veröffentlichung<sup>11</sup>, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile<sup>12</sup> : Betr. Anspruch Nr. 13

P,X Chemical Abstracts, Band 114,  
Nr. 3, erschienen 21. Januar  
1991 (21.01.91) (Columbus,  
Ohio, USA), F.B.Rayment et  
al. "The production of human  
parvovirus capsid proteins  
in Escherichia coli and their  
potential as diagnostic  
antigens", siehe Seite 203,  
rechte Spalte, Zusammen-  
fassung Nr. 18 831d; J. Gen.  
Virol. 1990, 71(11), 265-72.  
--

P,X WO, A1, 88/02 026  
(APPLIED BIOTECHNOLOGY, INC.),  
24 März 1988 (24.03.88); vgl.  
Patentansprüche 5-8, 38, 42-  
14

1.7.8

1.8

- Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:<sup>10</sup>
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

“Y” Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

#### IV. BESCHEINIGUNG

**Datum des Abschlusses der internationalen Recherche**

**Absendedatum des internationalen Rechercheberichts:**

09 April 1991

10.06.91

## Internationale Recherchenbehörde

Unterschrift des beauftragten Beobachters

Europäisches Patentamt

*D. TORIBIO* **Nuria TORIBIO**

## III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	Chemical Abstracts, Band 109, Nr. 17, erschienen 24 Oktober 1988 (24.10.88) (Columbus, Ohio, USA), K.Ozawa et al. "Translational regulation of B19 parvovirus capsid protein production by multiple up- stream AUG triplets", siehe Seite 177, linke Spalte, Zu- sammenfassung Nr. 143 557s; J. Biol. Chem. 1988, 263(22), 10922-6. -----	1